Plateforme Métabolisme-Métabolome, IFR87, Bâtiment 630 - IBP, Université Paris Sud XI, 91405 Orsay cedex, France

Référence Qualité

PROCEDURE _ PMM		
PCRE4_PO3006	**201005**	**1**

Méthode de traitement des données GC/TOF-MS

SOMMAIRE

I. OBJECT ET DOMAINE D'APPLICATION
II. REFERENCES
III. TERMES, ABREVIATIONS ET DEFINITIONS
IV. SECTIONS DE PROTOCOLE
IV.1 CONTACT :
IV.2 PRINCIPE DE LA METHODE
IV.3 MATERIELS NECESSAIRES
IV.4 ETAPE 1 : Traitement de base
IV.5 ETAPE 2 : Calcul des indices de rétention
IV.6 ETAPE 3 : Application du Module de Référence Standard
IV.7 ETAPE 4 : Vérification des identifications et des quantifications
IV.8 ETAPE 5 : Calcul des ratios et des moyennes
V. CHANGEMENT DU PROTOCOLE
VI. ANNEXES

DIFFUSION

Comité exécutif

Direction

Responsable qualité

Ingénieurs

Techniciens

Thésards

Rédacteur	Date	Lecteurs	Approbateurs	Visa
Mme GILARD	12/05/10	M. TCHERKEZ Melle. MAUVE	M. TCHERKEZ Melle. MAUVE	

Indice/Version	Nature de l'évolution	Responsable de l'évolution	Date
1			

I. OBJECT ET DOMAINE D'APPLICATION

Traitement des données GC/TOF-MS

II. REFERENCES

Cette méthode de traitement de données fait suite :

- au protocole d'injection des échantillons en GC-TOF-MS PCRE_PO3005
- à la procédure de récupération des données PCR_PO7055.

III. TERMES, ABREVIATIONS ET DEFINITIONS

GC : Gas chromatography (Chromatographie gazeuse)
MS : Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse)
TOF : Time Of Flight (temps de vol)
GC/TOF-MS : Spectrométrie de masse avec analyseur à temps de vol couplé à la Chromatographie gazeuse
QM : Masse utilisée pour la quantification des composés (Quant Mass)
MRS : Module de Référence Standard
Il constitue une bibliothèque privée de métabolites dont l'identification a été vérifiée et validée par la plateforme et qui sont caractérisés par un spectre de masse, un indice de rétention, une QM … Son application permet de rechercher et quantifier dans un échantillon donné tous les métabolites référencés par ce module.

IV. SECTIONS DE PROTOCOLE

IV.1 CONTACT :

Pilote procédé : Françoise Gilard
poste : 5 33 95
mail : francoise.gilard@u-psud.fr

IV.2 PRINCIPE DE LA METHODE

Cette méthode s'applique aux données brutes obtenues avec le GC/TOF-MS pour une série d'échantillons d'un même projet et pour le blanc réalisé lors du protocole d'extraction. Elle a pour but l'identification et la quantification de tous les métabolites présents dans les échantillons, sans à priori sur la nature des composés à rechercher.
Elle est basée sur l'utilisation, grâce au logiciel ChromaTOF, d'un module de référence standard qui constitue une base de données de métabolites caractérisés par leur indice de rétention et leur spectre de masse. L'identification des composés contenus dans cette base a été vérifiée. Cette base de données est régulièrement mise à jour.
Les composés identifiés sont quantifiés en mesurant l'abondance d'un ion fragment ou moléculaire de masse QM (intégration du pic chromatographique sur le courant ionique de l'ion choisi). Les aires obtenues sont normalisées par rapport à l'étalon interne (Adonitol ou ribitol) et au poids des échantillons ayant servi à l'extraction. Des calculs de moyennes et écarts-types sont réalisés dans Excel.

Contenu du mode opératoire

Etape 1 : Traitement de base
Etape 2 : Calcul des indices de rétentions
Etape 3 : Application du module de référence standard
Etape 4 : Vérification des identifications et des quantifications
Etape 5 : Calcul des ratios et des moyennes

IV.3 MATERIELS NECESSAIRES

- Logiciels ChromaTOF (version 2.22), NISTMS (version 2008) et Excel

- La langue d'entrée par défaut du PC doit être le français. (Dans le cas contraire, le tri par ordre alphabétique dans les tableaux excel risque d'être modifié et cela peut entraîner des erreurs dans les formules de calcul). Pour modifier la langue par défaut des programmes Office, il suffit de se référer au lien suivant : Utilisation d'une autre langue (http://office.microsoft.com/fr-fr/excel/CH100648301036.aspx).

- Dans excel, il est vivement recommandé d'utiliser également par défaut le point comme séparateur décimal. (Dans le cas contraire, les nombres non entiers copiés depuis ChromaTOF ne seront pas reconnus en tant que tels.) Le choix de ce séparateur décimal peut être appliqué en modifiant, dans le panneau de configuration, les "Options régionales et linguistiques" : Options régionales/Personnaliser.

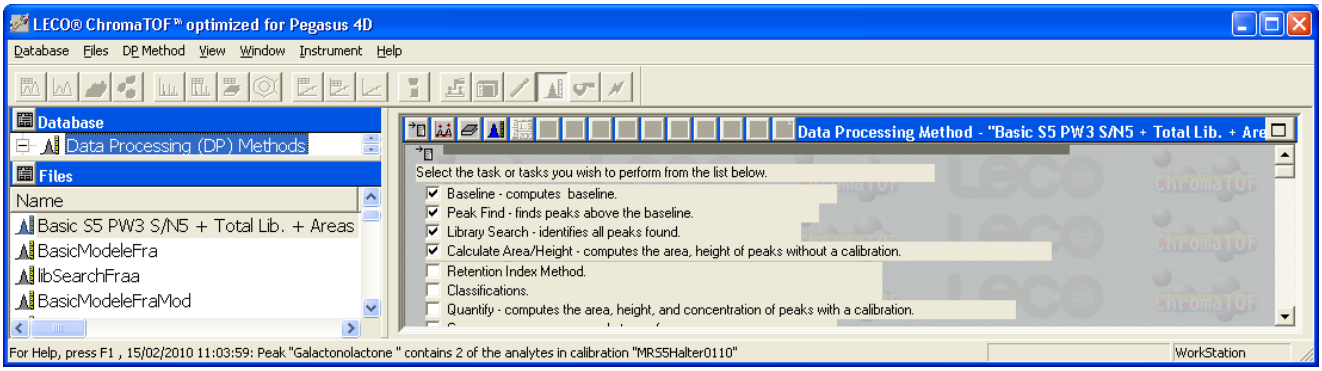
- Contenu du répertoire **MRSx (x = 5).** x est la version la plus récente du Module de Référence Standard
  Localisation : \\Clementine (\\129.175.60.22)
  Nom du répertoire : \Partage-Caro\MRSx
  login : metabolome
  password : plateforme

  Le répertoire BDDIR_IBP_avr09 se place sous le dossier NISTMS.
  Le répertoire MRS5 doit être restauré dans ChromaTOF. (A la restauration, choisir References / ModUnivTRrecalc / MRSx).
  Le fichier MRSversionx.xls sert à recalculer les Temps de Rétention des métabolites avant d'appliquer le module de référence. Un mode d'emploi est indiqué dans la feuille "Recalcul TR MRS". Les formules de calcul sont compatibles avec toutes les versions d'excel.
  Les fichiers verifInteg30Echx.xls et verifInteg100Echx.xls servent aux vérifications d'intégration et aux calculs de ratio et de moyennes.

IV.4 ETAPE 1 : Traitement de base

Le traitement de base des chromatogrammes inclut :
- la correction de la ligne de base et le lissage du chromatogramme
- la recherche de pics (apex)
- l'identification par recherche dans les librairies de spectres
- le calcul d'aire et de hauteur sous le pic pour quantifier chaque composé

Pour appliquer ce traitement, il est nécessaire de créer et d'appliquer une méthode DP (Data Processing) avec les paramètres suivants :


LECO® ChromaTOF™ optimized for Pegasus 4D
Database Files DP Method View Window Instrument Help
Database
Data Processing (DP) Methods
Files
Name
Basic S5 PW3 S/N5 + Total Lib. + Areas
BasicModeleFra
libSearchFraa
BasicModeleFraMod
Data Processing Method - "Basic S5 PW3 S/N5 + Total Lib. + Are
Select the task or tasks you wish to perform from the list below.
Baseline - computes baseline.
Peak Find - finds peaks above the baseline.
Library Search - identifies all peaks found.
Calculate Area/Height - computes the area, height of peaks without a calibration.
Retention Index Method.
Classifications.
Quantify - computes the area, height, and concentration of peaks with a calibration.
For Help, press F1 , 15/02/2010 11:03:59: Peak "Galactonolactone " contains 2 of the analytes in calibration "MRS5Halter0110"
WorkStation

Détection des pics

Ligne de base	0.25
Lissage du chromatogramme	5 points
Largeur attendue des pics	3 sec.
Nombre maximum de pics inconnus à détecter	1000
Rapport Signal/Bruit (S/N)	5

Identification des pics

Nombre de propositions	10
Poids moléculaire minimum autorisé	0
Poids moléculaire maximum autorisé	1000
Seuil de masse	50
Similarité minimale	750

Librairies utilisées

NIST (mainlib et replib 2008)
BDD_IBPdec05
BDD_IBPoct07
BDD_IBPnov07
GolmAnnotee
POL_FA_NIST

Calcul des aires

Masse unique

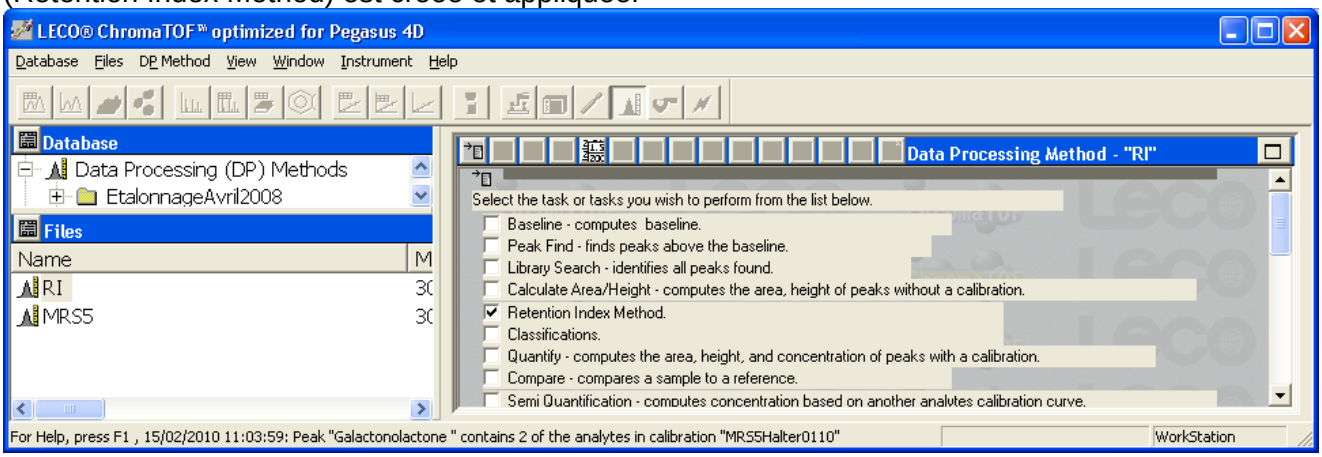
IV.5 ETAPE 2 : Calcul des indices de rétention

La valeur moyenne du temps de rétention de chaque alcane est relevée pour la série d'échantillons étudiées. Elle est notée dans une table d'indices de rétention de ChromaTOF (Retention Index Method) avec le format suivant :

#	Name	Absolute R.T. (s)	Retention Index	Verification Masses
1	C10	317	1000.0	85
2	C15	588.3	1500.0	85
3	C18	726	1800.0	85
4	C19	767.4	1900.0	85
5	C22	880.4	2200.0	85
6	C28	1068.3	2800.0	85
7	C32	1178	3200.0	85
8	C36	1325	3600.0	85

Pour rappel, m/z 85 est un ion fragment caractéristique de tous les alcanes et son affichage permet de situer facilement les alcanes dans un chromatogramme.

Une méthode DP (Data Processing) de calcul des indices de rétention appelant la table précédente (Retention Index Method) est créée et appliquée.


LECO® ChromaTOF™ optimized for Pegasus 4D
Database Files DP Method View Window Instrument Help
Database
Data Processing (DP) Methods
EtalonnageAvril2008
Files
Name
RI
MRS5
Data Processing Method - "RI"
Select the task or tasks you wish to perform from the list below.
Baseline - computes baseline.
Peak Find - finds peaks above the baseline.
Library Search - identifies all peaks found.
Calculate Area/Height - computes the area, height of peaks without a calibration.
Retention Index Method.
Classifications.
Quantify - computes the area, height, and concentration of peaks with a calibration.
Compare - compares a sample to a reference.
Semi Quantification - computes concentration based on another analytes calibration curve.
For Help, press F1 , 15/02/2010 11:03:59: Peak "Galactonolactone " contains 2 of the analytes in calibration "MRS5Halter0110"
WorkStation

IV.6 ETAPE 3 : Application du Module de Référence Standard

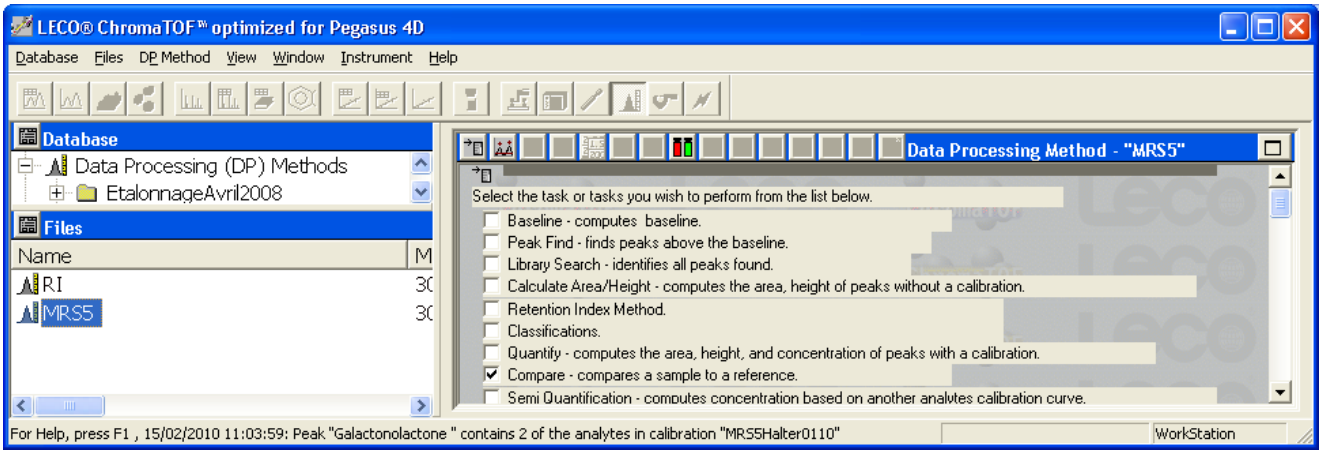
Le fichier MRSversionx.xls sert à recalculer les Temps de Rétention des métabolites avant d'appliquer le module de référence. Un mode d'emploi est indiqué dans la feuille "Recalcul TR MRS".

Une méthode DP (Data Processing) appliquant le module de référence standard MRSx est utilisée. Elle permet de rechercher dans chaque chromatogramme l'ensemble des métabolites présents dans notre base de données et pour lesquels l'identification a été vérifiée.

Paramètres de la méthode DP utilisant le module de référence

Comparaison

Seuil de masse	50
Module de référence utilisé	MRSx


LECO® ChromaTOF™ optimized for Pegasus 4D
Database Files DP Method View Window Instrument Help
Database
Data Processing (DP) Methods
EtalonnageAvril2008
Files
Name
RI
MRS5
Data Processing Method - "MRS5"
Select the task or tasks you wish to perform from the list below.
Baseline - computes baseline.
Peak Find - finds peaks above the baseline.
Library Search - identifies all peaks found.
Calculate Area/Height - computes the area, height of peaks without a calibration.
Retention Index Method.
Classifications.
Quantify - computes the area, height, and concentration of peaks with a calibration.
Compare - compares a sample to a reference.
Semi Quantification - computes concentration based on another analytes calibration curve.
For Help, press F1 , 15/02/2010 11:03:59: Peak "Galactonolactone " contains 2 of the analytes in calibration "MRS5Halter0110"
WorkStation

IV.7 ETAPE 4 : Vérification des identifications et des quantifications

Les fichiers verifInteg30echx.xls et verifInteg100echx.xls sont utilisés pour traiter une série pouvant aller respectivement jusqu'à 30 ou 100 échantillons. Les premiers onglets du fichier sont prévus pour contenir la liste de composés trouvés par MRSx (Peak Table) dans chaque chromatogramme. Le premier onglet [B] se rapporte au blanc réalisé lors du protocole d'extraction. Les onglets suivants (1, 2, …) se rapportent aux échantillons successifs. Il est donc préférable de nommer les échantillons d'un projet donné en les numérotant à partir de 1.

Le fichier verifInteg.xls contient également un onglet [Poids] qui doit être complété pour permettre de renormaliser par rapport au poids de chaque échantillon. Cet onglet donne aussi un mode d'emploi du fichier VerifInteg.xls.

- Dans Chromatof, décocher l'affichage des contaminants, et vérifier que l'ordre des colonnes correspond au même ordre que celui du fichier verifInteg.xls
- Pour chaque chromatogramme à traiter :
  - copier la « Peak table » par la commande Copy Selection
  - coller dans un onglet de verifInteg.xls
  - classer par ordre croissant de la colonne « Quantification »

L'onglet [BilanAires] donne pour chaque métabolite l'aire mesurée dans chaque chromatogramme.

L'onglet [BilanCorrections] redonne pour chaque métabolite l'aire mesurée dans chaque chromatogramme. Toutes les corrections sont effectuées dans cet onglet. A chaque fois qu'une aire est corrigée, la case correspondante apparaît en jaune. Par défaut, les aires nulles sont mises en évidence par une case orangée.
La colonne « Commentaire » peut être complétée pour spécifier différentes remarques. Par exemple :

- trop présent dans blanc lorsque les aires sont mises à 0 pour les échantillons parce qu'elles sont du même ordre de grandeur que celle trouvée dans le blanc.
- identification incertaine lorsque les aires sont mises à 0 pour les échantillons parce que l'identification du métabolite est incertaine.
- QM=86 préférable, lorsque l'on veut suggérer une modification du MRSx
- QM=86, lorsque l'on a modifié l'ion servant à la quantification
- …

Afin d'améliorer le Module de Référence Standard, 3 nouveaux onglets ont été ajoutés :
[BilanMatch] permet de savoir combien de fois chaque métabolite a été trouvé par le MRSx et calcule le match moyen lorsqu'un métabolite est trouvé.
[BilanRI] calcule l'indice de rétention moyen trouvé.
Pour chaque métabolite trouvé par le MRSx, [BilanUM] détermine le nombre d'échantillons pour lesquels la masse unique (UM) correspond à la masse utilisée pour la quantification (QM). S'il existe une UM différente de QM et plus fréquente, elle est calculée.

IV.8 ETAPE 5 : Calcul des ratios et des moyennes

Le fichier verifInteg.xls permet d'automatiser les étapes suivantes du traitement des données.

Une fois les corrections effectuées dans [BilanCorrections], l'onglet [BilanRatioRibitol] calcule les ratio au ribitol. Vérifier toujours que la formule utilisée est correcte (vérifier les numéros de ligne des cellules).

Pour chaque métabolite, l'onglet [BilanMoinsB] calcule la différence entre le ratio au ribitol mesuré dans l'échantillon et dans le blanc. Si le résultat est négatif, il est remplacé par une valeur seuil très faible. Cette valeur correspond à une aire de 500 divisée par l'aire maximale du ribitol dans les échantillons.

L'onglet [BilanPoids] rapporte les résultats obtenus dans [BilanMoinsB] au poids initial de chaque échantillon qui doit être précisé dans l'onglet [Poids]. La colonne « Max » calcule le ratio maximal obtenu pour chaque composé. S'il est nul, le composé est absent.

Le tri des métabolites est effectué dans l'onglet [BilanSansStds]. Dans cet onglet, la colonne « STD » notifie les standards qui seront éliminés des Résultats (alcanes, AABA, ribitol). La colonne « A

supp » renvoie vrai si le composé est un standard ou s'il est absent. On filtre les résultats à conserver par filtre automatique « faux » sur la colonne « A supp ».

Ces résultats sont copiés et collés dans l'onglet [ResultatsBruts] par collage spécial des valeurs.

L'onglet [histoMoy] contient un exemple de formule pour calculer les moyennes et les écarts-types pour des séries de 3 répliquats.

V. CHANGEMENT DU PROTOCOLE

Ce protocole devra être complété par :

- une « ETAPE 6 : Mise en forme des résultats bruts » qui décrira la création des histogrammes et le contenu du compte-rendu.
- une « ETAPE 7 : Analyse statistique »
- une « ETAPE 8 : Archivage des données »

VI. ANNEXES